

## MHC class I 분자들에 의해 제시되는 Epitope을 인지하는 CD8+ T 림프구의 결핵균 감염에 대한 면역반응의 연구: 결핵 환자와 PPD+ 건강개체에 존재하는 결핵균 항원에 특정한 CD8+ T세포

<sup>1</sup>연세대학교 의과대학 미생물학교실, <sup>2</sup>한림대학교 유전체응용 연구소, <sup>3</sup>국립마산결핵병원, <sup>4</sup>이화여자대학교 의과대학 동대문병원

조장은<sup>1</sup> · 이경화<sup>2</sup> · 박승규<sup>3</sup> · 천선희<sup>4</sup> · 조상래<sup>1</sup> · 조성애<sup>1</sup>

### The Study of MHC class I Restricted CD8+ T Cell Mediated Immune Responses against *Mycobacterium tuberculosis* Infection: Evidence of *M. tuberculosis* Specific CD8+ T Cells in TB Patients and PPD+ Healthy Individuals

Jang-Eun Cho<sup>1</sup>, Kyung Wha Lee<sup>2</sup>, Seung Kyu Park<sup>3</sup>, Seon-Hee Cheon<sup>4</sup>, Sang-Nae Cho<sup>1</sup> and Sungae Cho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Brain Korea 21 Project for Medical Sciences, Yonsei University Medical Center, <sup>2</sup>Hallym Institution for Genome Application Hallym University, <sup>3</sup>National Masan Tuberculosis Hospital, <sup>4</sup>Department of Internal Medicine, Emwa Womans University Tongdaemun Hospital

#### ABSTRACT

**Background:** The protective immunity against tuberculosis (TB) involves both CD4+ T cells and CD8+ T cells. In our previous study, we defined four *Mycobacterium tuberculosis* derived peptide epitopes specific for HLA-A\*0201 restricted CD8+ T cells (ThyA<sub>30-38</sub>, RpoB<sub>127-135</sub>, 85B<sub>15-23</sub>, PstA<sub>175-83</sub>). In this study, we investigated the immune responses induced by these peptide specific CD8+ T cells in latently and chronically infected people with TB. **Methods:** We characterized these peptide specific CD8+ T cell population present in PBMC of both TB patients and PPD+healthy people using IFN- $\gamma$  elispot assay, intracellular staining and HLA-A2 dimer staining. **Results:** The frequency of peptide specific CD8+ T cell was in the range of 1 to 25 in  $1.7 \times 10^5$  PBMC based on *ex vivo* IFN- $\gamma$  elispot assay, demonstrating that these peptide specific CD8+ T cell responses are induced in both TB patients and PPD+ people. Short term cell lines (STCL) specific for these peptides proliferated *in vitro* and secreted IFN- $\gamma$  upon antigenic stimulation in PPD+ donors. Lastly, HLA-A\*0201 dimer assays indicated that PstA<sub>175-83</sub> specific CD8+ T cell population in PPD+ healthy donors is heterogeneous since approximately 25~33% of PstA<sub>175-83</sub> specific CD8+ T cell population in PPD+ healthy donors produced IFN- $\gamma$  upon peptide stimulation. **Conclusion:** Our results suggest that MHC class I restricted CD8+ T cell mediated immune responses to *M. tuberculosis* infection are induced in both TB patients and PPD+ people; however, the CD8+ T cell population is functionally heterogeneous. (Immune Network 2003;3(3):235-241)

**Key Words:** *Mycobacterium tuberculosis*, CD8+ T cells, peptide epitopes, HLA-A\*0201, IFN- $\gamma$  elispot assay

책임저자 : 조성애, 연세대학교 의과대학 미생물학교실, ☎ 120-749, 서울시 서대문구 신촌동 134번지

Tel: 02-361-5390, Fax: 02-392-7088, E-mail: scho@yumc.yonsei.ac.kr

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2001-003-F00038).

## 서 론

세계보건기구의 자료에 의하면 전 세계적으로 매년 200~300만 명 가까운 사람이 결핵으로 인하여 사망하고 있는데, 전 세계 인구의 1/3인 약 20억 정도가 결핵균에 감염되어 있는 보균자로 추정되고 있다(1,2). 이렇게 결핵이 전 세계적으로 인류 건강에 큰 위협으로 다가오고 있는 데 반하여, 현재 유일하게 사용되고 있는 결핵 백신은 BCG (bacille Calmette-Gurin)뿐이다. 그러나, BCG 백신의 효율성이 매우 다양하며 성인에게서 일어나는 가장 흔한 결핵인 폐결핵에 대한 방어 효과는 거의 없다고 보고되고 있다. 따라서 결핵에 대한 백신 개발이 전 세계적으로 시급히 요구되고 있다. 이러한 결핵백신의 개발을 위하여 그리고 효과적인 치료제의 개발을 위하여 결핵에 대한 신체의 보호 면역 반응의 이해는 매우 중요하다고 할 수 있다. 아직까지 결핵이 유발되는 원인은 정확히 밝혀지지 않고 있으나, 대부분의 결핵균의 보균자인 사람들에서는 보호면역반응이 결핵의 발병을 억제하고 있으며, HIV 감염이나, 영양부족, 노화현상과 같이 신체의 면역반응이 균형을 이루고 있지 못할 때에 결핵이 발병한다고 보는 관점이 늘고 있다(3). 따라서 PPD+인 건강한 사람들은 결핵균의 보균자이면서 지연과민반응(Delayed Hypersensitivity Reaction)을 일으키기는 하지만 결핵이 발병하지는 않으며, 인류의 약 1/3인 20억 정도가 결핵균에 감염되어 있으나 실제로 감염된 개체가 결핵을 유발하는 확률은 일생에서 2~18%로 통계적으로 보고되고 있다(1,2).

결핵에 대한 면역반응에는 세포매개 면역반응이 그 주요한 면역기전이라고 밝혀져 왔는데 특히 CD4+ T 세포에 의한 면역기전의 중요성이 많이 강조되어 왔으며 최근에는 CD8+ T 세포에 의한 면역방어 기전의 중요성도 발표되고 있다. CD8+ T 세포들은 IFN- $\gamma$ 의 분비와 독성기전에 의해서 결핵균에 감염된 대식세포와 대식세포 안의 결핵균들을 죽일 수 있다는 것이 보고된 바 있다(4-8). 예를 들어서, CD8+ T 세포들은 항원공여세포의 표면에 있는 MHC class I 분자에 의해서 제시되는 항원 결정기들을 인지하고 이로 인해서 활성화되는데, 이때 MHC class I 분자에 의한 항원제시에 관여하는 TAP (Transporter Associated with Antigen Processing) 단백질이나, CD8+ T 세포,  $\beta$ 2-microglobulin을 표현하는 유전자에 삭제 돌연변이(deletion mutation)가 일어나면, 정상인 마우스보다 결핵균의 감염이 현저히 증가하는 것이 관찰되었다. 이와 같은 연구 결과는 CD4+ T 세포뿐만 아니라, CD8+ T 세포 또한 결핵의 보호면역기전에 그 역할이 크다는 것을 증명한 예이다(9-11).

이와 같이 마우스 model에서는 삭제 돌연변이 model 등을 사용하여 MHC class I 분자에 의해 제시되는 펩티

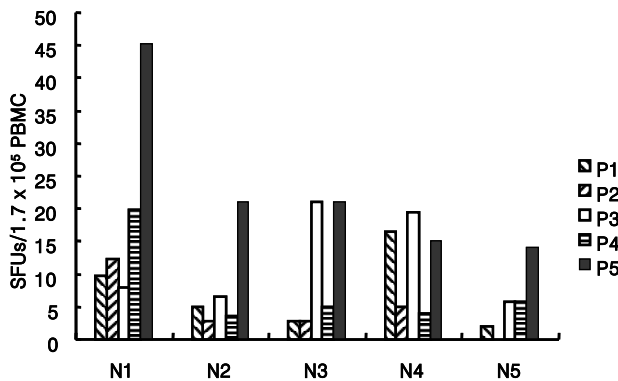
드를 인지하는 CD8+ T 세포의 중요성이 입증되어 왔지만, 실제로 사람에게 있어서는 결핵균 감염에서의 그 역할이 아직도 확실히 정의되고 있지 않다. 그러나, 한편으로 사람의 HLA class I 분자에 의해 제시되는 펩티드를 인지하는 CD8+ T 세포에 특정한 결핵균의 항원 결정기들이 동정되고는 있다. 이전의 본인의 연구에 의해서 사람의 HLA-A\*0201 분자에 의해 제시되는 펩티드를 인지하는 CD8+ T 세포에 특정한 4개의 결핵균 항원 결정기들이 동정된 바 있다(12). 이전 연구에서 이들 항원 결정기에 특정한 CD8+ T 세포들이 *in vitro* 상에서 독성을 나타내어서 실제로 결핵균으로 감염된 대식세포를 죽이고, 대식세포 내의 결핵균의 수를 감소시키며, IFN- $\gamma$ 를 분비할 수 있다고 보고되었다(12). 이렇게 *in vitro* 상에서 결핵균에 대한 보호 면역반응을 일으킬 수 있는 CD8+ T 세포가 실제로 신체의 말초혈구 내에서 어느 정도 유도되어 있는지에 대한 연구는 실제로 CD8+ T 세포가 어느 정도 결핵에 대한 보호면역 반응에 관여하는가에 대한 판단을 내릴 수 있게 한다. 결핵의 보호면역 반응에 있어서 IFN- $\gamma$ 는 세포매개면역 반응을 일으키는 주요한 요소로 알려져 있기 때문에, 본 연구에서는 결핵균으로 잠복감염이 된 PPD+ 건강개체와 만성감염이 되어 있는 폐결핵 환자의 말초혈구에서 결핵균의 항원 결정기에 특정한 CD8+ T 세포의 IFN- $\gamma$  분비능에 대한 양상을 분석하여서 결핵에 대한 신체의 보호 면역 반응을 연구해 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

**연구 대상.** HLA-A\*0201을 보유하고 있는 결핵 환자 4명(TB1-TB4)과 PPD+ 건강 개체 6명(N1-N6)에서 채취한 말초혈액을 연구대상으로 하였다(Table I). 결핵 환자는 국립마산 결핵병원에 요양 중이거나 이화여자대학교 의과대학 동대문병원에서 치료를 받고 있는 환자들

**Table I.** HLA-A molecule subtyping. The HLA-A typing of each blood donor was performed by DNA sequencing analysis of PBMC. Six PPD+ donors had the A\*0201 subtype. Four TB patient's HLA-A types were also determined by DNA sequencing

Normal donors	HLA-A type	TB patient donors	HLA-A type
N1	A*0201/A*1101	TB1	A*0201/A*1104
N2	A*0201/A*2402101	TB2	A*0201/A*2402
N3	A*0201/A*1101	TB3	A*0201/A*2402
N4	A*0201/A*31012	TB4	A*0201/A*2601
N5	A*0201/A*3001		
N6	A*0201/A*3303		



**Figure 1.** *Ex-vivo* IFN- $\gamma$  elispot assay as used to quantitate the frequency of circulating epitope-specific IFN- $\gamma$  secreting CD8+ T cells in HLA-A\*0201 PPD+ donors (N1-N5). Frequencies of four different *M. tuberculosis* derived epitope specific CD8+ T cells were determined in PBMC of HLA-A\*0201-PPD+ donors using *ex-vivo* IFN- $\gamma$  elispot assay. Results are expressed as the mean number of SFUs per  $1.7 \times 10^5$  PBMC. P1: "PstA1" amino acids 75-83 from phosphate transport system permease protein A-1, P2: "ThyA" indicates amino acids 30~38 from thymidylate synthase, P3: "RpoB" amino acids 127~135 from RNA polymerase-beta- subunit protein, P4: "85B" amino acids 15~23 from antigen 85B and P5: "Flu" indicates amino acids 58~66 from influenza virus-A matrix protein as a positive control (18). "SFUs" indicates spot forming units for IFN- $\gamma$  elispot assay.

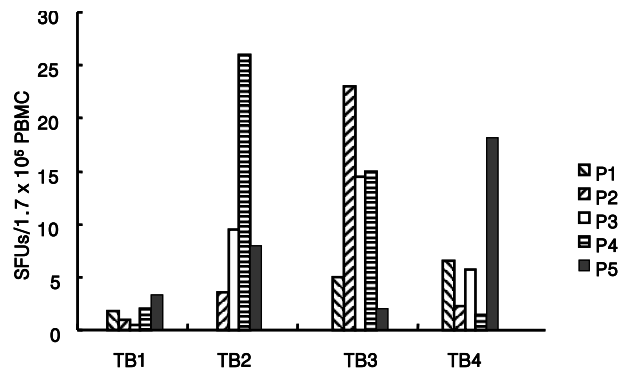
이었다.

결핵 환자들은 모두 폐 이외에는 다른 장기로 이환된 경우가 없었고, 환자의 특징은 Table II에 요약되어 있다. PPD+ 건강 개체는 tuberculin PPD (Statens serum institute, Copenhagen, Denmark) 검사에서 6 mm 이상 크기의 지연과민반응을 나타낸 사람을 임의적으로 선별하였다.

**HLA-A 형별 분석.** 결핵환자와 PPD+ 건강 개체의 HLA-A 형별은 PCR-SBT (PCR sequence based typing method) 방법으로 확인하였다(13). 즉, 각 개체의 말초혈액에서 분리된 백혈구에서 DNA를 추출하였으며, HLA-A 유전자좌-특이 PCR primer set와 증합효소를 이용하여 HLA-A 유전자의 다형적 부위(exon 2와 exon 3)를 증폭하고 BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, DA, USA)와 DNA 자동염기서열 측정기(ABI3100)를 이용하여 HLA-A 유전자 염기서열을 확인하고 형별을 분석하였다.

**펩티드 합성.** 본 연구에서 사용된 펩티드의 이름과 특성, 아미노산 서열은 Table III에 요약되어 있으며, 고려 대학교에 부속되어 있는 기초과학지원 연구소에서 각각 합성되었다.

**IFN- $\gamma$  Elispot Assay.** HLA-A\*0201을 표현하는 결핵환자와 PPD+인 건강개체에게서 말초혈구를 채취하고 Dynabeads<sup>®</sup>CD4(Dynal biotech, NY, USA)을 사용하여



**Figure 2.** *Ex-vivo* IFN- $\gamma$  elispot assay as used to quantitate the frequency of circulating epitope-specific IFN- $\gamma$  secreting CD8+ T cells in HLA-A\*0201 TB patient donors. Frequencies of four different *M. tuberculosis* derived epitope specific CD8+ T cells were determined in PBMC of HLA-A\*0201-TB patient donors (TB1-TB4) using *ex-vivo* IFN- $\gamma$  elispot assay. Results are expressed as the mean number of SFUs per  $1.7 \times 10^5$  PBMC. Peptides numbers (P1-P5) correspond to the designation in Figure 1.

CD4+ T 세포들을 제거하였다. Assay plate는 anti-IFN $\gamma$  mAb로 하루 동안 코팅하였다. 다음날 CD4+ T 세포가 제거된 말초혈구를  $1 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^5$ 로 희석하고 펩티드, anti-CD28 mAb (1 $\mu$ g/ml), IL-2 (10 units/ml)을 넣고 이를 동안 자극시켰다. 그 다음, biotinylated anti-IFN- $\gamma$  mAb를 넣고 2시간 동안 반응시킨 다음, streptavidine-alkaline phosphatase 접합체를 넣고 30분 동안 반응시켰다. 기질을 넣고 반응을 지속시킨 다음, 각각의 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 세포들은 색깔이 있는 점으로 보여지게 되는데, 확대 현미경을 사용하여 그 수를 측정하였다.

**단기 세포주(short term cell line) 생성.** HLA-A\*0201을 표현하는 사람의 말초혈액을 채취하고 각각  $3 \times 10^6$ 의 말초혈구씩을 10% 자가혈장과 펩티드(10 $\mu$ g/ml), 재조합 IL-7 (10 ng/ml)과 keyhole limpet hemocyanin (5 $\mu$ g/ml, Sigma)을 포함하는 1 ml RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 5일 후에 재조합 IL-2를 10 units/ml의 농도로 가하고 다시 5일을 더 배양하였다.

**세포표면 표지와 세포 내 IFN- $\gamma$ 의 FACS 염색.** 각각의 펩티드로 적재된 autologous EBV line으로 10일 배양된 단기 세포주를 2시간 동안 자극시켰다. 계속해서 brefeldin A (1 $\mu$ g/ml)를 8~10시간 동안 가했다. 단기 세포주를 4°C에서 FACS 완충액 (0.5% BSA와 0.02% sodium azide가 들어 있는 PBS)에서 FITC에 접합된 anti-CD8 mAb와 Percp에 접합된 anti-CD3 mAb와 같이 30분 동안 배양하였다. 표지된 세포들을 FACS 완충액으로 씻은 다음, 고정용액으로 15분 동안 실온에서 고정하였다. 다시 세포들을 씻은 다음, Perm/Wash (Pharmingen) 용액을 가하고, PE가 접합된 anti-IFN- $\gamma$  mAb로 15분 동안 실온에서 반

**Table II.** Characterization of TB patients. Each TB patient was diagnosed as pulmonary tuberculosis and the disease severity was graded as mild, moderate and severe

Patients	Age	Sex	Severity	MDR-TB
TB1	40	M	moderate	No
TB2	37	M	mild	No
TB3	29	M	mild	No
TB4	30	M	severe	Yes

응시했다. 다시 1% paraformaldehyde로 고정하고, flow cytometry (Becton Dickinson)를 사용하여 분석하였다.

**Dimer 염색.** Dimeric complexes는 HLA-A2: Ig protein과 PstA1<sub>75-83</sub> 펩티드를 640 molar ratio 이상으로 PBS (pH 7.2)에 같이 넣고 섞은 다음, 37°C에서 하룻밤 동안 결합시켰다. 다음날, PstA1<sub>75-83</sub> 펩티드에 특정하게 생성된 단기 세포주를 2μg의 다클론 human IgG와 10분 동안 실온에서 반응시킨 다음, 1~2μg의 펩티드로 적재된 HLA-A2: Ig protein과 4°C에서 60분 동안 반응시켰다. 계속해서, 단기 세포주를 FACS 완충액으로 씻었다. 다클론 human IgG 10μl를 가하고, 10분 동안 실온에서 반응시켰다. 단기 세포주를 PE에 접합된 anti-mouse IgG1과 FITC에 접합된 anti-CD8 mAb와 같이 4°C에서 30분 동안 반응시켰다. 다시 1% paraformaldehyde로 고정하고, flow cytometry를 사용하여 분석하였다.

## 결 과

**PPD+ 건강개체의 말초혈구에서 결핵균의 항원 결정기에 특정한 CD8+ T 세포의 양상.** 결핵균에 존재하는 항원 결정기에 특정한 MHC class I restricted CD8+ T 세포의 보호 면역 반응이 결핵균의 보균자이기는 하나 건강한 PPD+ 개체에게서 유도되어 있는지를 연구하기 위해서, Table I에서 보여지는 바와 같이 본 연구에서 분석된 말초혈구는 모두 HLA-A\*0201 형별을 갖고 있는 사람에게서 유래하였다. 본 연구에서는 실제로 결핵균의 4개의 항원 결정기에 특정한 MHC class I restricted CD8+ T 세포의 말초혈액 내에서의 빈도를 IFN-γ elispot assay를 사용하여 측정하였다. 본 연구로 실제로 HLA-A\*0201 형별을 갖고 있는 건강하며 PPD+인 사람에게서 결핵균의 항원 결정기에 특정하게 활성화된 CD8+ T 세포들이 존재하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 참고로 이러한 CD8+ T 세포들이 독성을 띠고 있는 사실도 예비실험에서 관찰할 수 있었다. 본 결과의 중요성은 실제로 PPD+인 건강개체에서도 본 실험에서 사용한 결핵균의 항원 결정기에 특정한 CD8+ T 세포들이 말초혈구 내에서 유도되어 있으며 결핵에 대한 보호면역반응에 관여할 수 있다는 사실을 제시한다. 한편으로

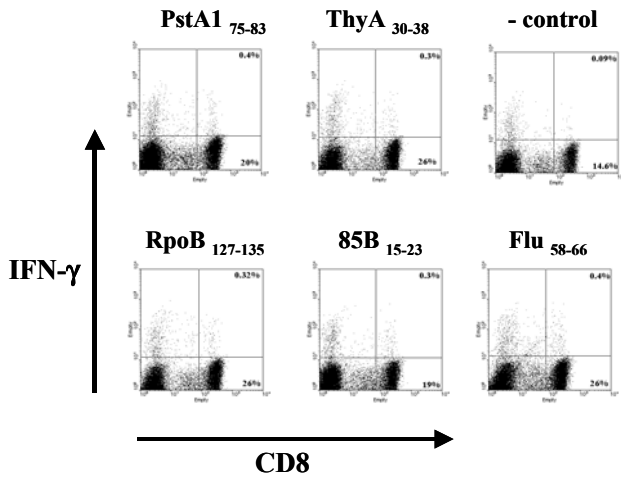
**Table III.** List of epitope peptides used in this study

Peptide name	Source of peptide	Site	A.A. sequence	Length
ThyA <sub>30-38</sub>	Thymidylate synthase	30-38	RLPLVLPVAV	9
RpoB <sub>127-135</sub>	RNA polymerase-βsubunit	127-135	MTYAAPLFV	9
85B <sub>15-23</sub>	Antigen 85B	15-23	LMIGTAAAV	9
PstA <sub>175-83</sub>	Putative phosphate transport system permease protein A-1	75-83	SLYFGGICV	9
Flu <sub>58-66</sub>	Influenza virus matrix protein	58-66	GILGFVFTL	9

는 같은 HLA-A 형별을 갖고 있는 개인들에서도 각각의 항원 결정기에 특정한 CD8+ T 세포의 빈도가 다르게 나타났다. 이와 같은 양상은 한가지 항원 결정기보다 여러 가지 항원 결정기를 복합한 결핵 백신이 많은 사람을 대상으로 하는 백신 개발에 더 효율적일 수 있다는 사실을 또한 제시한다.

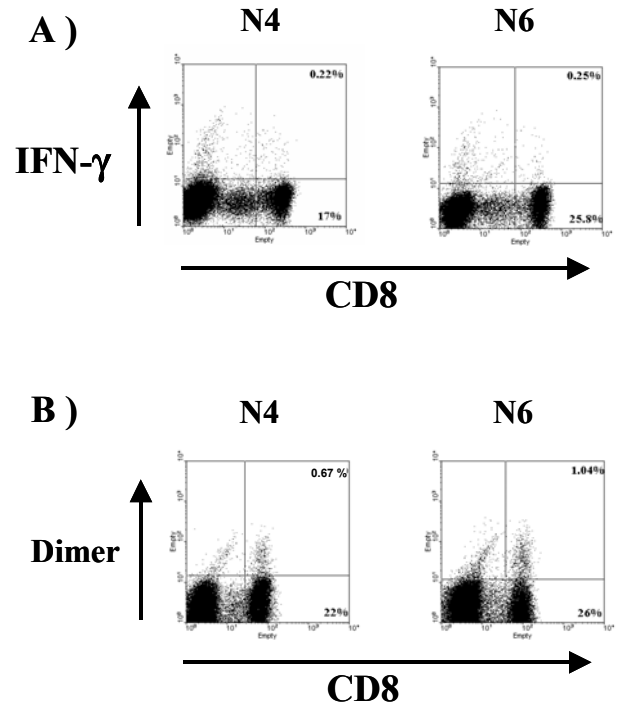
**결핵 환자의 말초혈구에서 결핵균의 항원 결정기에 특정한 CD8+ T 세포의 양상.** 다음으로 이러한 결핵균의 항원 결정기들에 특정한 CD8+ T 세포의 빈도를 실제로 HLA-A\*0201을 가진 결핵 환자의 말초혈액에서 조사하였는데, 결핵 환자에게서도 역시 항원 결정기에 특정한 CD8+ T 세포들이 존재하고 있으며, 사람마다 빈도가 다르게 존재하고 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 또한 T 세포 미토겐인 PHA (Phytohemagglutinin)로 자극을 주었을 때 세포매개 면역반응이 저하되어 있는 사람에게서는(TB 4) 그렇지 않은 사람(TB 2 and TB 3)보다 대부분의 결핵균 항원 결정기에 특정하게 IFN-γ를 분비하는 CD8+ T 세포의 빈도가 상대적으로 낮은 것으로 관찰되었다.

**결핵균의 항원 결정기에 특정하게 IFN-γ를 분비하는 CD8+ T 세포주의 생성.** PPD+인 건강개체에게서 유도되어 있는 각각의 항원 결정기에 특정한 CD8+ T 세포들이 실제로 펩티드로 자극시켰을 때, 활성화되어서 증식할 수 있는지를 연구하였다. PPD+인 정상개체에서 각각의 항원 결정기로 10일 동안 자극을 주었을 때 단기 세포주(Short term cell line)가 생성되는 것을 관찰할 수 있었고, 이렇게 증식된 CD8+ T 세포들은 각각의 항원 결정기에 특정하게 IFN-γ를 분비하는 것을 세포 내 IFN-γ 염색방법을 통하여 6명의 정상개체(N1-N6)에서 모두 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이렇게 증식된 CD8+ T



**Figure 3.** Intracellular IFN- $\gamma$  staining for HLA-A\*0201 restricted peptide reactive CD8+ T cell population in a HLA-A\*0201 donor. STCL from donor N5 was stimulated with each peptide overnight (PstA1, ThyA, 85B, RpoB and Flu). Eight to ten hours later, cells were stained with IFN- $\gamma$  and CD8+ specific monoclonal antibody labeled with PE and FITC, respectively. Peptide specific IFN- $\gamma$  secretion from CD8+ T cell population of STCL was observed. Flu peptide was used as a positive control and nonspecific peptide was used as a negative control. The experiment is representative of intracellular IFN- $\gamma$  staining assays using six donors' STCL.

세포 집단의 비율은 개체마다 차이는 있으나 flu 펩티드에 의해 증식된 CD8+ T 세포 집단과 비교될 만하였다. PPD+인 건강인의 말초혈액에서 생성된 단기 세포주에서 PstA1<sub>75-83</sub>에 특정한 CD8+ T 세포의 기능적 다양성. 여러 보고된 바에 의하면 실제로 항원 결정기에 결합할 수 있는 CD8+ T 세포의 수와 기능적으로 IFN- $\gamma$ 를 분비할 수 있는 수는 다를 수 있다는 연구결과가 나오고 있다. 즉, 같은 항원 결정기에 결합하여 기능적으로 인지를 할 수 있는 T 세포 수용체를 가진 CD8+ T 세포 집단 내에서도 기능적으로 이질성이 있다는 보고들이 있다. 따라서 PstA1<sub>75-83</sub>에 특정하게 생성된 CD8+ T 세포주에서 PstA1<sub>75-83</sub>에 특정하게 T 세포 수용체를 소유하는 CD8+ T 세포의 빈도를 PstA1<sub>75-83</sub> 펩티드로 적재된 HLA-A\*0201 dimer를 사용하여 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 HLA-A\*0201을 표현하는 PPD+인 두 정상개체의 말초혈액에서 생성된 세포주를 IFN- $\gamma$  세포 내 염색과 HLA-A\*0201 dimer 염색을 하여서 빈도를 측정하였는데, 세포 내 싸이토카인 염색방법으로 측정된 PstA1<sub>75-83</sub> 펩티드에 특정한 CD8+ T 세포 집단 (0.22~0.25%)과 HLA-A\*0201 dimer로 측정된 PstA1<sub>75-83</sub> 펩티드에 특정한 CD8+ T 세포 집단 (0.67~1.04%)의 빈도가 다르다는 사실을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 결과는 실제로 항원 결정기의 자극이 왔을 때 반응하는 CD8+ T 세포 집단의 빈도는 실제로 항원 결정기에 특정한 T



**Figure 4.** Intracellular IFN- $\gamma$  staining and HLA-A\*0201 dimer staining for PstA1<sub>75-83</sub> specific STCL generated from donors, N4 and N6. PstA1<sub>75-83</sub> specific CD8+ T cell population in STCL generated from PBMC of HLA-A\*0201 donors was detected by IFN- $\gamma$  intracellular staining (A) and HLA-A\*0201 dimer staining (B).

세포 수용체를 가진 CD8+ T 세포에 비해 빈도가 낮다는 사실을 제시한다.

## 고 찰

결핵의 감염에 대한 신체의 보호면역 반응에 있어서, 결핵균에 대한 독성을 나타내는 CD8+ T 세포의 면역반응이 실제로 인체 내에서 어느 정도 유도가 되며, 기능적으로 활발하게 독성을 나타내어 방어 기전에 그 역할이 있는가는 오랜 동안 제기되어온 질문이다. 실제로 최근에 발표된 논문에 의하면, 보균자이기는 하지만 결핵의 병증을 갖고 있지 않은 사람에게서 결핵균에 존재하는 Esat 6 (early secretory antigenic target) 항원에 특정한 CD8+ T 세포의 수가 실제로 많이 증가되어 있으며, *in vitro* 상에서 자극이 왔을 때 CD8+ T 독성세포의 재활성화가 빨리 나타나는 것이 발표된 바 있다(14). 그동안 결핵 환자에게서 CD8+ T 세포에 의한 면역 반응이 유도되어 있다는 보도들은 있었지만, 실제로 CD8+ T 세포들이 인체의 결핵 감염에 있어서 보호면역 작용뿐만 아니라, 조직의 파괴나 병증 유발에도 관여할 수가 있으므로, 방어면역에서의 역할을 정의 내리기가 어려웠다고 할 수 있다. 그러나 이렇게 PPD+ 이면서 잠복감염이

되어 있지만 건강한 사람들에게서도 이러한 CD8+ T 세포에 의한 면역 반응이 유도되어 있다는 사실은 이들이 보호면역 반응에 관여하고 있다는 정의를 내릴 수 있게 한다(14-17). 또한 그동안은 결핵균에 존재하는 분비항원(secreted antigen)의 면역성에 관한 연구가 치중되어 온 데 반하여, 본 연구에서는 군체항원(somatic antigen)에 특정한 CD8+ T 세포의 면역 반응이 실제로 PPD+인 건강개체들에서 보호 면역 반응을 일으키는 데 관여한다는 사실을 제시한다. 따라서 결핵균의 면역 반응에 관한 연구나 백신개발에 있어서 분비항원뿐만 아니라 군체항원에 대한 검색 또한 이루어져야 한다고 사료된다.

말초혈구에서 생성된 단기세포주 내에서 HLA-A\*0201과 펩티드로 결합된 dimer를 이용하여 특정한 CD8+ T 세포의 빈도를 보았을 때, 이들 특정한 CD8+ T 세포 집단의 약 1/3에서 1/4만이 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 BCG 백신을 맞은 건강인의 말초혈액에서 결핵균의 85A 항원에 대한 CD8+ T 세포의 집단에서도 관찰된 사항이다(15). 그러므로 이러한 실험들은 인체 내의 어떤 특정한 결핵균의 펩티드에 반응할 수 있는 CD8+ T 세포 집단들에서 일부는 기억 세포들로 있다가 특정한 항원 결정기의 자극이 왔을 때, 바로 효과 세포들로 바뀌고, 일부는 기능이 저하된 상태에서 면역반응을 보이지 않고 있다는 것을 제시한다. 이 같이 결핵균의 항원 결정기에 반응할 수 있는 CD8+ T 세포 집단의 기능적 다양성에 대한 분석 연구가 계속되어야 하고, 이러한 CD8+ T 세포의 기능적 다양성을 고려해서 백신 개발에 참고해야 한다고 생각된다.

본 연구에서는 이전에 발표된 결핵균의 항원 결정기들에 특정하게 반응하는 MHC class I restricted CD8+ T 세포들이 실제로 결핵환자와 PPD+ 인 건강 개체들에서도 체내를 순환하는 말초혈액 내에서 존재하고 있는지를 알아보고자 하였다. 특히, IFN- $\gamma$ 를 분비하는 CD8+ T 세포의 기능의 연구에 초점이 맞추어 졌는데, 결핵의 보호면역 기전에 있어서 IFN- $\gamma$ 에 의해 유도되는 세포 매개면역이 매우 중요하다고 알려져 있기 때문이다(19). 본 연구 결과는 결핵의 백신 개발을 위한 항원 결정기나 아단위백신들의 동정에 있어서 군체항원 까지도 포함을 하여야 한다는 사실을 제시한다. 왜냐하면 현재까지 170 개의 결핵 백신이 개발되어 왔으나 그 효율성이 약 50% 정도로 추정되는 BCG보다 나은 백신은 아직까지 개발이 되지 않고 있기 때문이다. 마지막으로 CD8+ T 세포에 대한 항원 결정기의 동정에 더 많은 연구를 수행하여서 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포에 특정한 항원 결정기들이 결합된 백신을 개발하게 되면 효율성이 증가된 결핵백신이 생산되리라고 기대된다(20,21).

## 참 고 문 헌

1. World Health Organization. The World Health Report (WHO/OMS, Geneva), 1999
2. World Health Organization. Tuberculosis. Fact Sheet No.104, WHO, 2000
3. Tufariello JM, Chan J, Flynn JL: Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection 3;578-590, 2003
4. Shams H, Wize B, Weis SE, Samten B, Barnes PF: Contribution of CD8 (+) T cells to gamma interferon production in human tuberculosis. Infect Immun 69;3497-3501, 2001
5. Scanga CA, Mohan VP, Yu K, Joseph H, Tanaka K, Chan J, Flynn JL: Depletion of CD4+ T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. J Exp Med 192;347-358, 2000
6. Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, Cho S, Barnes PF, Rosat JP, Sette A, Brenner MB, Porcelli SA, Bloom BR, et al: Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. Science 276;1684-1687, 1997
7. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Melian A, Bogdan C, et al: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. Science 282;121-125, 1998
8. Serbina NV, Lazarevic V, Flynn JL: CD4 (+) T cells are required for the development of cytotoxic CD8 (+) T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Immunol 167; 6991-7000, 2001
9. Ladel CH, Dargatzis S, Kaufmann SH: Immune response to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette Guerin infection in major histocompatibility complex class I- and II-deficient knock-out mice. contribution of CD4 and CD8 T cells to acquired resistance. Eur J Immunol 25;377-384, 1995
10. Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Koller B, Bloom BR: Major histocompatibility complex class I-Restricted T cells are required for resistance to mycobacterium tuberculosis infection. Proc Natl Acad Sci USA. 89;12013-12017, 1992
11. Behar SM, Dascher CC, Grusby MJ, Wang CR, Brenner MB: Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. J Exp Med 189;1973-1980, 1999
12. Cho S, Mehra V, Thoma-Uszynski S, Stenger S, Serbina N, Mazzaccaro RJ, Flynn JL, Barnes PF, Southwood S, Celis E. et al: Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8+ T cells in human tuberculosis. Proc Natl Acad Sci USA 97;12210-12215, 2000
13. Hurely CK: Sequence-based typing for HLA-A. class I sequencing amplification of exons 2 and 3 based upon Cereb. In: Tilanus MG, Hansen JA, Hurley CK, eds. IHWG Technical Manual. Seattle, International Histocompatibility Working Group; TM7A 1-5, 2000
14. Pathan AA, Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Latif M, McShane H, Pasvol G, Hill AV, Lalvani A: High frequencies of circulating IFN-gamma-secreting CD8 cytotoxic T cells specific for a novel MHC class I-restricted *Mycobacterium tuberculosis* epitope in *M. tuberculosis*-infected subjects without disease. Eur J Immunol 30;2713-2721, 2000
15. Smith SM, Brookes R, Klein MR, Malin AS, Lukey PT, King AS, Ogg GS, Hill AV, Dockrell HM: Human CD8+ CTL specific for the mycobacterial major secreted antigen 85A. J Immunol 15;165(12):7088-7095, 2000
16. van Pinxteren LA, Cassidy JP, Smedegaard BH, Agger EM, Andersen P: Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* infec-

- tion is dependent on CD8 T cells. Eur J Immunol 30; 3689-3698, 2000
17. Bothamley GH, Festenstein F, Newland A: Protective role for CD8 cells in tuberculosis. Lancet 339(8788);315-316, 1992
  18. Bednarek MA, Sauma SY, Gammon MC, Porter G, Tamhankar S, Williamson AR, Zweerink HJ: The minimum peptide epitope from the influenza virus matrix protein. Extra and intracellular loading of HLA-A2. J Immunol 147;4047-4053, 1991
  19. Tascon RE, Stavropoulos E, Lukacs KV, Colston MJ: Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by CD8+ T cells requires the production of gamma interferon. Infect Immun 66;830-834, 1998
  20. Alexander J, Oseroff C, Dahlberg C, Qin M, Ishioka G, Beebe M, Fikes J, Newman M, Chesnut RW, Morton PA, et al: A decapeptide polypeptide primes for multiple CD8+ IFN-gamma and Th lymphocyte responses: Evaluation of multiepitope polypeptides as a mode for vaccine delivery. J Immunol 168;6189-6198, 2002
  21. Fonseca DP, Benaissa-Trouw B, Marloes van Engelen, Kraaijeveld CA, Snippe H, Verheul AFM: Induction of cell-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis* using DNA vaccines encoding cytotoxic and helper T-Cell epitopes of the 38-Kilodalton protein. Infect Immun 69;4839-4845, 2001
-